

THESIS

BONN

1969

DAS VERHALTEN ESTEROLYTISCH bzw. PROTEOLYTISCH
WIRKSAMER FERMENTS SYSTEME IM PFOTENGeweBE, IN
DER LEBER, IN DER NIERE UND IM SERUM DER RATTE
BEI DER KAOLIN-ARTHRITIS OHNE UND MIT
EINFLUSS VON PHENYL BUTAZON

Ulrich Müller-Velten

DAS VERHALTEN ESTEROLYTISCH bzw. PROTEOLYTISCH
WIRKSAMER FERMENTSYSTEME IM PFOTENGeweBE, IN
DER LEBER, IN DER NIERE UND IM SERUM DER RATTE
BEI DER KAOLIN-ARTHRITIS OHNE UND MIT
EINFLUSS VON PHENYLBUTAZON

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Zahnheilkunde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von
Ulrich Müller-Velten
aus Rodenkirchen

Bonn 1969

Angefertigt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

Referent : Prof. Dr. med. K. Mörsdorf
Korreferent: Prof. Dr. med. R. Domenjoz

Aus dem Pharmakologischen Institut der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn

Direktor: Prof. Dr. med. R. Domenjoz

Tag der mündlichen Prüfung: 14. 7. 1969



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153520_0038

Inhalt

- A. Einleitung und Problemstellung
- B. Zur Methodik der durchgeführten Untersuchungen
 - I. Versuche zur Esterolyse
 - II. Methodik zur Erfassung proteolytischer Vorgänge
 - III. Methodik der Tierversuche
- C. Experimentelle Befunde
 - I. Entzündungsversuche
 - II. Das Verhalten esterolytisch bzw. proteolytisch wirksamer Fermentsysteme im Pfortengewebe
 - III. Das Verhalten esterolytisch bzw. proteolytisch wirksamer Fermentsysteme im Lebergewebe
 - IV. Das Verhalten esterolytisch bzw. proteolytisch wirksamer Fermentsysteme in Nierengewebe
 - V. Das Verhalten esterolytisch wirksamer Fermentsysteme im Serum
- D. Diskussion
- E. Zusammenfassung
- F. Literaturverzeichnis

A. Einleitung und Problemstellung

Betrachtet man den pathophysiologischen Ablauf der Entzündung mit allen heute bekannten Faktoren und Bedingungen, so wird erklärlich, daß der Begriff der Entzündungswidrigkeit mindestens ebenso komplex ist.

In der initialen Phase der Entzündung werden im Rahmen der allgemeinen Stoffwechselsteigerung u.a. auch Fermente aktiviert, die zu einer Freisetzung biologisch hochaktiver Stoffe führen, denen im Rahmen der Entzündung durchaus eine Bedeutung als Mediator zugemessen werden kann. Unter diesen sogenannten Entzündungsstoffen scheinen besonders im Hinblick auf die Gefäßwirkung Produkte des Proteinabbaues, in erster Linie Polypeptide, am wichtigsten zu sein (DOMENJOZ). So wird heute der Aktivierung gewebseigener Fermente, vor allem Proteasen, aber auch Esterasen allgemein eine pathogenetische Bedeutung für die Einleitung der Entzündungsreaktion zugesprochen.

KALBHEN sowie KALBHEN und DOMENJOZ fanden im entzündeten Gewebe einen erhöhten Gehalt an freien Aminosäuren, der in direkter Beziehung zur Intensität der Entzündung stand und im Sinne einer gesteigerten Proteolyse gedeutet wurde.

Eine gesteigerte Proteolyse, die annähernd parallel zur Stärke der entzündlichen Schwellung verlief, fanden MÖRSDORF, HARDT sowie SCHULZE in vitro in Homogenaten, die aus entzündetem Pfortengewebe der Ratte gewonnen waren. HLADOVEC und Mitarb. konnten ein vermehrtes Auftreten einer Esterase, die das synthetische Substrat Acetyl-Tyrosin-Äthylester (ATEE) spaltet, im Gewebe der Rattenpforte bei der Kaolin-Arthritis feststellen. MÖRSDORF sowie DONNER konnten ebenfalls die Aktivierung eines ATEE-spaltenden Fermentes für die Beispiele der Dextran-, Formalin- und Trypsin-bedingten Entzündung an der Ratte nachweisen.

Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus von Antiphlogistika, d.h. Pharmaka, die in der Lage sind, entzündliche Vorgänge zu hemmen, brachten erst in den letzten Jahren nähere Anhaltspunkte über deren mögliche Wirkungsweise. So werden heute neben Einflüssen auf zentralnervöse und endokrine Regulationsmechanismen vor allem periphere Wirkungen diskutiert, u.a. auch der Einfluß dieser Pharmaka auf verschiedene Fermentsysteme, denen im Rahmen der Entzündung eine Bedeutung beigemessen wird.

MÖRS DORF, HARDT sowie SCHULZE konnten die durch die Entzündungsreaktion (Formalin- bzw. Dextran-Oedem) gesteigerten autoproteolytischen Prozesse in Homogenaten aus Rattenpfotengewebe durch Na-Salicylat, Oxyphenbutazon, Phenylbutazon und andere Antiphlogistika in vitro hemmen. In ähnlicher Weise werden auch durch entzündliche Vorgänge aktivierte esterolytische Prozesse in vitro durch anti-inflammatorisch wirksame Verbindungen gehemmt (CORNELISSEN, sowie MÖRS DORF und CORNELISSEN).

Auch am Ganztier konnte durch Vorbehandlung mit Antiphlogistika die entzündlich bedingte Aktivierung eines esterspaltenden Fermentes gehemmt werden (HLADOVEC und Mitarb., sowie DONNER).

In der vorliegenden Arbeit interessierte uns, ob und in welchem Maße bei der Kaolin-Arthritis neben Änderungen der proteolytischen und esterolytischen Fermentaktivität im Rattenpfotengewebe auch andere Gewebe, wie Leber, Niere und Blut ähnliche Stoffwechselveränderungen in Abhängigkeit von der Entzündungsreaktion aufweisen. Ferner sollte der Einfluß einer in vivo durchgeführten Behandlung der Versuchstiere mit Phenylbutazon auf Entzündungsreaktion, proteolytische und esterolytische Aktivität der vorgenannten Gewebe untersucht werden.

B. Zur Methodik der durchgeführten Untersuchungen

Entsprechend der Problemstellung teilt sich die durchgeführte Untersuchung in zwei Abschnitte

I. Versuche zur Esterolyse

II. Versuche zur Proteolyse

Zunächst sei die Problematik der von uns verwendeten Methoden dargelegt.

I. Versuche zur Esterolyse

1. Prinzip der von uns verwendeten Methode

Wir verwendeten für unsere Versuche zur Klärung der Esteraseaktivität im Gewebe N-Acetyl-L-Tyrosin-Äthylester (ATEE) als Substrat. Die Spaltung von ATEE durch esterolytische Enzyme wird mit Hilfe einer von RYBAK, MANSFELD, PETAKOVA und SIMONIANOVA angegebenen Methode, die wir auf unsere Versuchsbedingungen einstellten, bestimmt.

Die Methode beruht auf der verschiedenen Löslichkeit eines Diazokomplexes von gespaltenem und ungespaltenem ATEE in Wasser und organischen Lösungsmitteln. Die mit der hydrophoben Alkylgruppe von Äthylalkohol veresterte Karboxylgruppe des Acetyltyrosin verstärkt die Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln, wohingegen die nach der ATEE-Hydrolyse freie Karboxylgruppe des Acetyltyrosin die Löslichkeit in Wasser erhöht. Die Esterbindung von ATEE wird während der Hydrolyse aufgespalten und dadurch Acetyltyrosin freigesetzt. Die Menge des freigewordenen Acetyltyrosin bestimmt das Ausmaß der esterolytischen ATEE-Spaltung. Das ungespaltene ATEE wird ebenso wie das Acetyltyrosin mit dem Diazoniumsalz von p-Nitroanilin komplex gebunden, wobei eine intensiv rote Farbe entsteht. Der Diazokomplex von ATEE kann aber aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaft durch Essigsäureäthylester extrahiert werden, wohingegen der Diazokomplex von Acetyltyrosin infolge seiner hydrophilen Eigenschaft fast vollständig in der wässrigen Phase

verbleibt, deren Farbintensität spektrophotometrisch bei der Wellenlänge 500-510 nm leicht erfaßt werden kann.

2. Änderung der Methode nach RYBAK und Mitarb.

Bei der Darstellung der im einzelnen von uns vorgenommenen Änderungen der Methode nach RYBAK und Mitarb. wurden unsere Erfahrungen hinsichtlich notwendiger Änderungen der Originalmethode berücksichtigt und praktisch nur die Ergebnisse der Vorversuche dargestellt, ohne jeweils direkten Bezug auf die Methode nach RYBAK und Mitarb. zu nehmen.

Folgende Vorversuche waren notwendig:

- a. Kinetische Untersuchungen zur Bestimmung einer günstigen Inkubationsdauer
- b. Günstiger pH-Bereich für die Bestimmung der Esteraseaktivität sowohl in entzündetem, als auch in nichtentzündetem Gewebe
- c. Benötigte Menge an Gewebshomogenat bzw. Serum
- d. Einfluß von Phenylbutazon auf den Acetyltyrosin-Diazoniumkomplex
- e. Stabilität des Acetyltyrosin-Diazoniumkomplexes in Abhängigkeit von der Zeit
- f. Farbintensität des Acetyltyrosin-Diazoniumkomplexes in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge des Diazogemisches
- g. Hydrolyse von ATEE im sauren Bereich

Im folgenden seien die notwendigen Vorversuche zur Ermittlung eines exakten methodischen Vorgehens unter unseren Versuchsbedingungen näher geschildert.

zu a.: Kinetische Untersuchungen zur Bestimmung einer günstigen Inkubationsdauer

Wir bemühten uns, die Umsatzgeschwindigkeit der ATEE-Hydrolyse unter unseren Versuchsbedingungen konstant zu halten und untersuchten deshalb verschiedene Mengen an Serum

und verschiedene ATEE-Konzentrationen und kamen dabei zu dem Ergebnis, daß unter den Bedingungen, ATEE-Konzentration 2×10^{-2} M und Serumverdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1+14, das Ausmaß der ATEE-Spaltung für unsere Versuche am geeignetsten erschien. Dabei verfolgten wir die fermentative Umsatzrate folgender Ansätze in Abhängigkeit der Zeit:

- Ansatz 1** 0,5 ml ATEE-Lösung; Konz. 2×10^{-2} M
als Blank in 5% Dimethylformamid als Lösungsvermittler gelöst
 0,5 ml Sörensenpuffer pH 5,5 1/15 M
 0,5 ml aqua dest.
 2,0 ml Trichloressigsäure (TCA) 10%
 0,5 ml Serumverdünnung
- Ansatz 2** 0,5 ml ATEE-Lösung; Konz. 2×10^{-2} M
 0,5 ml Sörensenpuffer pH 5,5 1/15 M
 0,5 ml aqua dest.
 0,5 ml Serumverdünnung
 2,0 ml TCA

In Ansatz 2 wurde durch die Zugabe der Serumverdünnung die esterolytische Reaktion gestartet und nach bestimmten Zeitabständen gestoppt. Die Blanks und Proben wurden nach dem von uns modifizierten Verfahren bearbeitet und bei der Wellenlänge 500 nm gegen Wasser gemessen. Unsere Ergebnisse sind in Abb. 1 dargestellt. Aus dem Kurvenverlauf ist zu ersehen, daß während 20 Minuten die Umsatzgeschwindigkeit der ATEE-Hydrolyse konstant blieb. Innerhalb dieser Zeit findet ein Umsatz statt, der meßtechnisch gut erfaßbar ist. Auch für die mit Gewebshomogenaten vorgenommenen Untersuchungen erwies sich der ATEE-Umsatz innerhalb der Zeitspanne von 20 Minuten bei einer ATEE-Konzentration von 2×10^{-2} M hinreichend konstant, sodaß wir für unsere Untersuchungen ausschließlich eine Inkubationsdauer von 20 Minuten wählten.

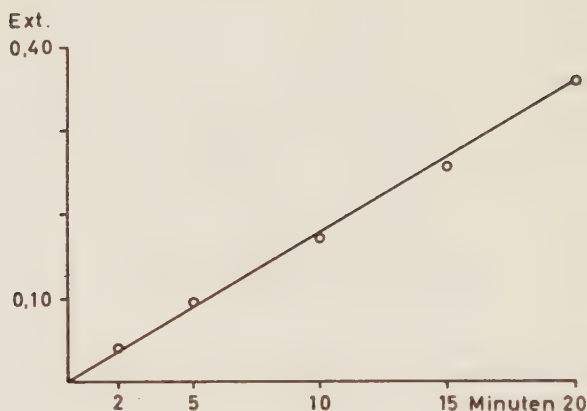


Abb. 1: Umsatz-Zeit-Kurve der ATEE-Hydrolyse unter Verwendung von Serum

zu b.: Günstiger pH-Bereich für die Bestimmung der Esteraseaktivität sowohl in entzündetem, als auch in nichtentzündetem Gewebe

Für unsere Versuchsbedingungen war zu überprüfen, ob Unterschiede bezüglich des pH-Optimum bestehen zwischen entzündetem und nichtentzündetem Gewebe. Wir untersuchten deshalb die Esteraseaktivität im Gewebe entzündeter (Kaolin-Arthritis) und nichtentzündeter Pfoten bei verschiedenen pH-Werten. Zur Gewinnung von Pfotenhomogenat, das als Enzymlösung für unsere Versuchsansätze benutzt wurde, versetzten wir die amputierten Pfoten mit der doppelten Menge ihres Gewichtes mit physiologischer Kochsalzlösung

und zerkleinerten die Pfoten im Bühler Homogenisator. Das nach Abpressen des Gewebebreies erhaltene Homogenat wurde mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1+9 verdünnt. Für die Ansätze wurden Sörensenpuffer 1/15 M von pH 5,5, 6,0 und 7,5 und zu Vergleichszwecken auch Trispuffer 0,5 M von pH 7,5 verwendet.

Folgende Ansätze wurden untersucht:

- Ansatz 1 0,5 ml ATEE-Lösung; Konz. 2×10^{-2} M
als Blank 0,5 ml Sörensenpuffer 1/15 M pH 5,5; 6,0; 7,5

bzw. 0,5 ml Trispuffer 0,5 M pH 7,5
 0,5 ml aqua dest.
 2,0 ml TCA 10%
 0,5 ml Pfotenhomogenat
- Ansatz 2 0,5 ml ATEE-Lösung; Konz. 2×10^{-2} M
 0,5 ml Sörensenpuffer 1/15 M pH 5,5; 6,0; 7,5

bzw. 0,5 ml Trispuffer 0,5 M pH 7,5
 0,5 ml aqua dest.
 0,5 ml Pfotenhomogenat
 2,0 ml TCA 10%

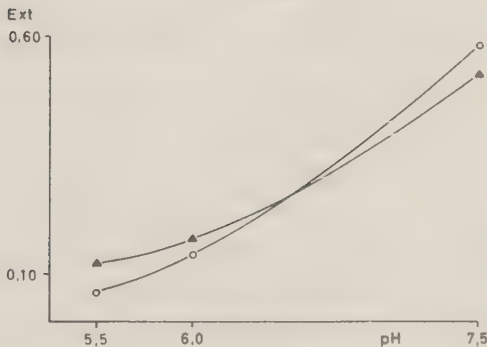


Abb. 2: ATEE-Umsatz bei verschiedenen pH-Werten

- Esteraseaktivität im nichtentzündeten Gewebe
▲—▲ Esteraseaktivität im entzündeten Gewebe

Aus diesen Versuchen, dargestellt in Abb. 2, ergibt sich, daß mit zunehmendem pH-Wert auch das Ausmaß der ATEE-Spaltung größer wird, was mit Angaben der Literatur (KAUFMANN und Mitarb.) übereinstimmt.

Bei unseren Versuchen für das Beispiel der Kaolin-Arthritis ließ sich eine Steigerung esterolytischer Prozesse im entzündeten Gewebe, wie dies in der Literatur beschrieben wird, nur im sauren pH-Bereich exakt nachweisen. Aus diesem Grund erfolgten alle unsere Untersuchungen bei pH 5,5.

zu c.: Benötigte Menge an Gewebshomogenat und Serum
Zur Bestimmung der notwendigen Menge an Gewebshomogenat bzw. Serum für einen meßtechnisch gut erfaßbaren ATEE-Umsatz unter Berücksichtigung einer ATEE-Konzentration von 2×10^{-2} M, der Inkubationsdauer von 20 Minuten und dem pH-Wert von 5,5 wurden die aus Pfoten, Lebern und Nieren gewonnenen Homogenate (Organgewicht + zweifache Menge an physiologischer Kochsalzlösung zur Homogenisierung) sowie Serum mit verschiedenen Volumina physiologischer Kochsalzlösung nach folgendem Schema versetzt:

1 ml Pfotenhomog.	versetzt mit 1; 2; 4	ml 0,9% NaCl
1 ml Leberhomog.	versetzt mit 4; 9; 19; 29	ml 0,9% NaCl
1 ml Nierenhomog.	versetzt mit 4; 9; 19; 29	ml 0,9% NaCl
1 ml Serum	versetzt mit 7; 14; 28; 56	ml 0,9% NaCl

Die Versuchsergebnisse sind in Abb. 3 graphisch dargestellt. Der ATEE-Umsatz zeigte sich abhängig von der in den einzelnen Homogenat- bzw. Serumverdünnungen vorhandenen Enzymmenge.

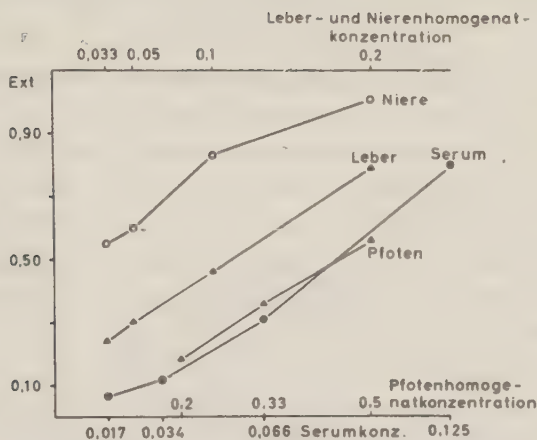


Abb. 3: ATEE-Umsatzrate für verschiedene Mengen Gewebshomogenat bzw. Serum

Im Hinblick auf die bereits beschriebenen Versuchsbedingungen wählten wir für unsere Untersuchungen folgende Verdünnungen für Homogenat bzw. Serum

1 ml Pfotenhomogenat	+ 2 ml 0,9% NaCl
1 ml Leberhomogenat	+ 19 ml 0,9% NaCl
1 ml Nierenhomogenat	+ 19 ml 0,9% NaCl
1 ml Serum	+ 14 ml 0,9% NaCl

zu d.: Einfluß von Phenylbutazon auf den Acetyltyrosin-Diazoniumkomplex

Im Rahmen unserer Untersuchungen versuchten wir die Frage zu klären, ob Phenylbutazon die Komplexbildung von Acetyltyrosin mit dem Diazoniumsalz von p-Nitroanilin beeinflusst. Hierzu wurden Versuchsansätze in drei Serien erstellt. In Serie 1 wurde das Ausmaß der normalen ATEE-Spaltung ermittelt. In Serie 2 wurde der Einfluß von Phenylbutazon

auf den Acetyltyrosin-Diazoniumkomplex untersucht. In Serie 3 wurde der Einfluß von Phenylbutazon auf die ATEE-Spaltung bestimmt.

Für alle Versuchsansätze wurde dieselbe ATEE-Stammlösung, ATEE-Lösung 2×10^{-2} M, Sörensenpuffer 1/15 M, pH 5,5 und aqua dest. zu gleichen Teilen gemischt, verwendet. 1,4 ml dieser ATEE-Stammlösung wurden mit 0,1 ml Sörensenpuffer (in Serie 1 und 2) bzw. 0,1 ml Phenylbutazon-Lösung in verschiedenen Konzentrationen (in Serie 3) auf ein Volumen von 1,5 ml gebracht; durch Zugabe von 0,5 ml Serumverdünnung (1 ml Serum verdünnt mit 14 ml 0,9% NaCl) erfolgte der Start der esterolytischen Reaktion. Unmittelbar vor Versuchsende wurden 0,1 ml Sörensenpuffer (in Serie 1 und 3) bzw. 0,1 ml Phenylbutazon-Lösung (in Serie 2) zugegeben und mit 2,0 ml TCA die Reaktion gestoppt. Durch dieses Vorgehen war die Einhaltung gleicher Konzentrationsverhältnisse in allen Versuchsserien gegeben.

Nachstehend eine Zusammenstellung der in den drei Serien überprüften Ansätze:

Serie 1: normale ATEE-Spaltung

a. Blank	1,4 ml ATEE-Stammlösung
	0,1 ml Sörensenpuffer
	2,0 ml TCA 10%
	0,5 ml Serumverdünnung
	0,1 ml Sörensenpuffer
b. Probe	1,4 ml ATEE-Stammlösung
	0,1 ml Sörensenpuffer
	0,5 ml Serumverdünnung
	vor Reaktionsende
	0,1 ml Sörensenpuffer
	2,0 ml TCA 10%

Serie 2: Einfluß von Phenylbutazon auf den Acetyltyrosin-Diazoniumkomplex

- a. Blank 1,4 ml ATEE-Stammlösung
 0,1 ml Sörensenpuffer
 2,0 ml TCA 10%
 0,5 ml Serumverdünnung
 0,1 ml Phenylbutazon-Lösung; Konz. 420 mg%
 105 mg%; 21 mg%
- b. Probe 1,4 ml ATEL-Stammlösung
 0,1 ml Sörensenpuffer
 0,5 ml Serumverdünnung

 vor Reaktionsende
 0,1 ml Phenylbutazon-Lösung; Konz. 420 mg%
 105 mg%; 21 mg%
 2,0 ml TCA 10%

Serie 3: Einfluß von Phenylbutazon auf die ATEE-Hydrolyse

- a. Blank 1,4 ml ATEE-Stammlösung
 0,1 ml Phenylbutazon-Lösung; Konz. 420 mg%
 105 mg%; 21 mg%
 2,0 ml TCA 10%
 0,5 ml Serumverdünnung
 0,1 ml Sörensenpuffer
- b. Probe 1,4 ml ATEE-Stammlösung
 0,1 ml Phenylbutazon-Lösung; Konz. 420 mg%
 105 mg%; 21 mg%
 0,5 ml Serumverdünnung

 vor Reaktionsende
 0,1 ml Sörensenpuffer
 2,0 ml TCA 10%

Setzt man die unbeeinflusste Umsatzrate = 100, d.h. Hemmung = 0, so erhält man durch Umrechnung der gemessenen Umsatzwerte die entsprechenden Hemmwerte, die in der folgenden Abb. 4 dargestellt sind.

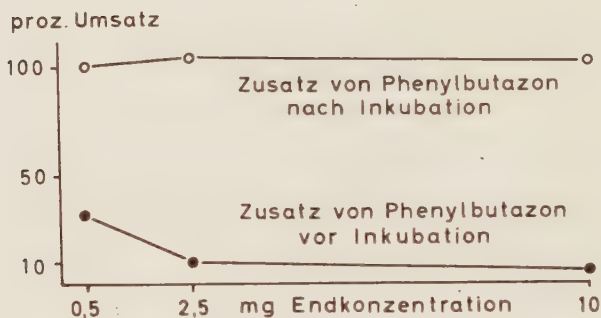


Abb. 4: Einfluß von Phenylbutazon auf die Acetyltyrosin-Diazoniumkomplexbildung bzw. auf die enzymatische Spaltung von ATEE

Aus dem Kurvenverlauf ist eine Beeinflussung der Komplexbildung von Acetyltyrosin mit dem Diazoniumsalz von p-Nitroanilin nicht zu ersehen, während die enzymatische Spaltung von ATEE durch Phenylbutazon konzentrationsabhängig gehemmt wird.

zu e.: Stabilität des Acetyltyrosin-Diazoniumkomplexes
Für unseren weiteren Untersuchungen war es von Interesse, die Stabilität des Acetyltyrosin-Diazoniumkomplexes in Abhängigkeit von der Zeit zu untersuchen.

Folgende Ansätze wurden erstellt:

Ansatz 1 0,5 ml ATEE-Lösung; Konz. 2×10^{-2} M
als Blank 0,5 ml Sörensenpuffer pH 5,5 1/15M
 0,5 ml aqua dest.
 2,0 ml TCA 10%
 0,5 ml Pfotenhomogenat als Fermentlösung
 (1 ml Homogenat + 9 ml 0,9% NaCl)

Ansatz 2 0,5 ml ATEE-Lösung; Konz. 2×10^{-2} M
 0,5 ml Sörensenpuffer pH 5,5 1/15M
 0,5 ml Pfotenhomogenat
 0,5 ml aqua dest.
 2,0 ml TCA 10%

Die Extinktionswerte von jeweils zwei Blanks und vier Proben wurden fortlaufend über eine Zeitspanne von 155 Minuten gemessen. Die Mittelwerte der Messungen sind in der Abb. 5 graphisch dargestellt.

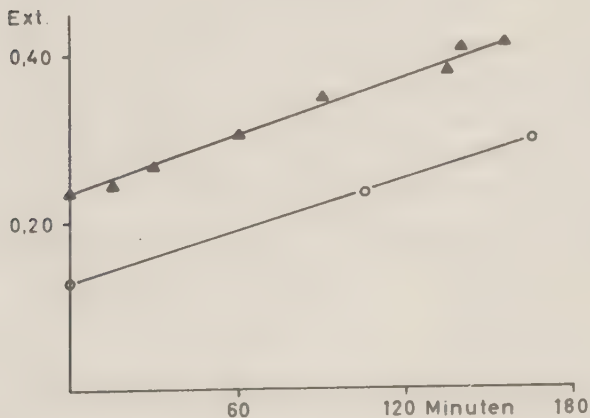


Abb. 5: Extinktionsänderungen des AT-Diazoniumkomplexes in Abhängigkeit von der Zeit

○ — ○ Blanks

▲ — ▲ Proben

Aus dem Kurvenverlauf ist zu erkennen, daß die für den Acetyltyrosin-Diazoniumkomplex gemessenen Extinktionswerte nicht konstant sind, sondern vielmehr in Abhängigkeit von der Zeit linear ansteigen. Aus diesem Grund wurden bei unseren Messungen alle Proben nach einem konstanten Zeitplan verarbeitet und gemessen.

zu f.: Farbintensität des Acetyltyrosin-Diazoniumkomplexes in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge Diazogemisches

Im Rahmen unserer Untersuchungen galt es auch zu überprüfen, in welcher Abhängigkeit die Komplexbildung des Acetyltyrosin mit dem Diazogemisch steht. Dazu wurden Ansätze nach folgendem Muster erstellt:

0, 5 ml ATEE-Lösung; Konz. 2×10^{-2} M
0,5 ml Sörensenpuffer pH 5,5 1/15 M
0,5 ml aqua dest.
0,5 ml Pfotenhomogenat als Fermentlösung
(1 ml Pfotenhomogenat + 9 ml 0,9% NaCl)

Derartige Ansätze wurden 20 Minuten inkubiert und die Reaktion wie üblich mit 2,0 ml TCA 10% gestoppt. Den Proben wurde Diazogemisch in verschiedenen Mengen zugegeben. In der folgenden Aufstellung sind die Extinktionswerte für die entsprechenden Mengen an Diazogemisch wiedergegeben.

Menge an Diazogemisch	Extinktionswerte
0,05 ml	0,380
0,10 ml	0,620
0,20 ml	1,050

Aus diesen Befunden ist zu ersehen, daß die Menge des zugesetzten Diazogemisches genau dosiert sein muß. Wir wählten deshalb für unsere Untersuchungen immer die Zugabe von 0,1 ml Diazogemisch zur Bildung des Acetyltyrosin-Diazoniumkomplexes.

zu g.: Hydrolyse von ATEE im sauren Bereich

In weiteren Untersuchungen sollte die Frage geklärt werden, ob und wenn in welchem Ausmaß im sauren Bereich eine Spontanhydrolyse von ATEE stattfindet. Die Spaltung von ATEE in Trichloressigsäure, entsprechend unseren Ansätzen, wurde über eine Zeitspanne von zwei Stunden bei einem pH-Wert von 0,5 verfolgt. Hierzu wurden Ansätze nach folgendem Muster erstellt:

0,5 ml ATEE-Lösung; Konz. 2×10^{-2} M
0,5 ml Sörensenpuffer pH 5,5 1/15 M
1,0 ml aqua dest.
2,0 ml TCA 10%

Aus der Abb. 6, die unsere Versuchsergebnisse darstellt, ist zu ersehen, daß die Extinktionswerte in Abhängigkeit von der Zeit ansteigen, also eine Hydrolyse von ATEE durch TCA bzw. im sauren Bereich stattfindet. Aus diesem Grund erwies es sich unbedingt notwendig, für die Bearbeitung der einzelnen Proben im Rahmen unserer Untersuchung konstante Zeitabstände einzuhalten.

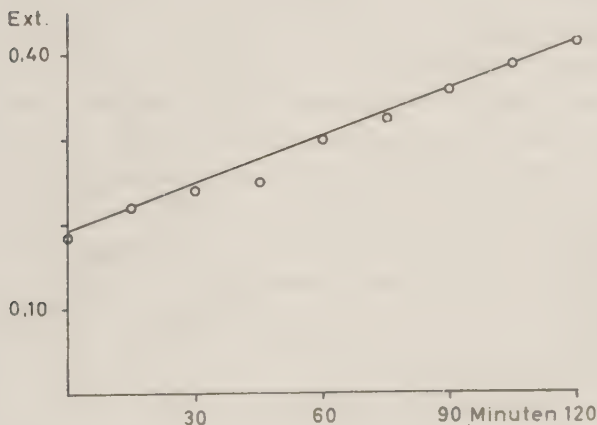


Abb. 6: Hydrolyse von ATEE in Trichloressigsäure

Unter Berücksichtigung der vorgehend geschilderten Änderungen der Originalmethode von RYBAK und Mitarb. verwendeten wir zur quantitativen Erfassung einer enzymatischen ATEE-Spaltung nachstehendes Verfahren. Prinzipiell waren alle Ansätze wie folgt zusammengestellt:

- 0,5 ml ATEE-Lösung; Konz. 2×10^{-2} M
in 5% Dimethylformamid als Lösungsvermittler
gelöst
- 0,5 ml Sörensenpuffer pH 5,5 · 1/15 M
- 0,5 ml aqua dest.
- 0,5 ml Homogenat bzw. Serumverdünnung

Alle Lösungen wurden vor Versuchsbeginn jeweils frisch angesetzt. Die Blanks wurden zweifach, die Proben vierfach erstellt. Die Ansätze wurden gemäß dem für die Vorversuche beschriebenen Arbeitsgang 20 Minuten bei 37° C inkubiert und die Esterolyse mit 2,0 ml 10%iger Trichloressigsäure gestoppt. Nach Abfiltrieren des Niederschlages wurden von dem Filtrat 2,0 ml zur Weiterverarbeitung entnommen. Dieser Arbeitsvorgang dauerte insgesamt 20 Minuten. Den Proben wurden dann innerhalb 6 Minuten in Abständen von 30 Sekunden jeweils 0,1 ml Diazogemisch⁺ zugegeben. In weiteren 6 Minuten erfolgte ebenfalls in Abständen von 30 Sekunden die Zugabe von 5,0 ml einer 20%igen Natriumkarbonatlösung. Der Diazokomplex von ATEE wurde mit 2,0 ml Essigsäureäthylester ausgeschüttelt. Dieser Arbeitsgang dauerte ebenfalls 6 Minuten, wobei die Zugabe von Essigsäureäthylester zu den einzelnen Proben in Abständen von 30 Sekunden erfolgte. Die Proben wurden dann eine Minute bei 1500 U.p.M. zur schnelleren Trennung der Esterphase zentrifugiert und der Überstand abgesaut. Für dieses Vor-

⁺ Zubereitung des Diazogemisches:

8 ml von 0,3% p-Nitroanilin in 8%iger HCl werden mit 1 ml 5% Natriumnitrit nahe 0° C gemischt und für mehrere Minuten stehengelassen.

gehen benötigten wir eine Zeitspanne von 15 Minuten. Die Blanks und Proben wurden bei Einhaltung unseres konstanten Zeitplanes ebenfalls in Abständen von 30 Sekunden zur Ermittlung der Extinktionswerte des Acetyltyrosin-Diazoniumkomplexes bei der Wellenlänge 500 nm im Spektralphotometer gemessen.

II. Methodik zur Erfassung proteolytischer Vorgänge

Proteolytische Prozesse wurden in unseren Untersuchungen für Pforten-, Leber- und Nierengewebe nach deren Homogenisierung erfaßt. Unser Vorgehen richtete sich dabei nach Angaben von MORS DORF; d.h. Inkubation der Homogenate in Sörensenpuffer pH 5,5 1/15 M; Inkubationsdauer eine Stunde; stoppen der Reaktion mit Trichloressigsäure; abfiltrieren des Niederschlages und photometrische Bestimmung der säurelöslichen Bruchstücke der Proteinhydrolyse bei 280 nm.

Die einzelnen Ansätze waren nach folgendem Muster zusammengestellt:

Ansatz 1	1,0 ml Homogenat
als Blank	2,0 ml Sörensenpuffer pH 5,5 1/15 M
	3,0 ml TCA 6%
Ansatz 2	1,0 ml Homogenat
	2,0 ml Sörensenpuffer pH 5,5 1/15 M
	Inkubation während einer Stunde bei 37° C
	3,0 ml TCA 6%

Die verwendeten Homogenate wurden wie folgt erstellt:

a. Pfortenhomogenate

Zerkleinern der Pforten im Bühler Homogenisator unter Zugabe der doppelten Gewichtsmenge an physiologischer Kochsalzlösung; das nach Abpressen des Gewebestreifens erhaltene Homogenat wurde direkt verwendet. Im Falle der Pfortenaufarbeitung von entzündeten Tieren (Gruppen III und IV) wurden die entzündeten bzw. nichtentzündeten Pforten jeweils getrennt verarbeitet, wobei zur Erzielung derselben Verdünnung die Gewichts Differenz zwischen entzündeten und nichtentzündeten Pforten mit physiologischer Kochsalzlösung ausgeglichen wurde.

b. Leber- und Nierenhomogenate

Gewebsproben wurden mit der doppelten Gewichtsmenge physiologischer Kochsalzlösung im Bühler homogenisiert und anschließend mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1+5 verdünnt und dann verwendet.

III. Methodik der Tierversuche

Wir verwendeten als Tiere männliche Wistar-Ratten (Inzuchtstamm der Fa. Reupohl), einer Zulieferung entstammend. Die Tiere wurden unter üblichen Laborbedingungen gehalten.

Als Modellentzündung wählten wir die sog. Kaolin-Arthritis (HILLEBRECHT).

Kaolin entspricht den Anforderungen, die an ein Phlogistikum gestellt werden. Die Entzündung soll möglichst örtlich begrenzt sein. Schwere unmittelbare Schäden müssen vermieden werden. Allgemeinreaktionen, etwa vom Stress-Charakter oder Allergien sollen nicht ausgelöst werden. Stärke des Ödems und zeitlicher Ablauf der Entzündung sollen möglichst gleichmäßig und damit reproduzierbar sein.

Nach HILLEBRECHT, WILHELM, GARATTINI, WAGNER-JAUREGG ist die Kaolin-Arthritis durch orale Gaben von Phenylbutazon gut hemmbar. Wir verabreichten dieses Pharmakon in einer Dosis von 300 mg/kg eine Stunde vor Auslösung der Entzündung per os mittels Schlundsonde. Das Ausmaß der entzündlichen Reaktion mit und ohne Hemmung durch Phenylbutazon wurde durch Bestimmung der Gewichts-differenz zwischen entzündeten und nichtentzündeten Pfoten ermittelt.

Art der Vorbehandlung der Versuchstiere

Entsprechend der Aufgabenstellung gliederte sich unser Tiermaterial in mehrere Gruppen, die jeweils auf verschiedene Art vorbehandelt wurden:

Gruppe , I: normale Kontrolltiere, d.h. ohne Entzündung und ohne Vorbehandlung mit Phenylbutazon

Gruppe II: Tiere ohne Entzündung, aber vorbehandelt mit 300 mg/kg Phenylbutazon per os; Tötung der Tiere in einzelnen Serien durch Nackenschlag und anschließendes Ausbluten 3, 5 und 7 Stunden nach der Verabreichung von Phenylbutazon

Gruppe III: Tiere mit Kaolin-Arthritis; 0,1 ml einer 10%igen, wässrigen Kaolinsuspension; Tötung der Tiere in einzelnen Serien durch Nackenschlag 2, 4 und 6 Stunden nach der Kaolin-Applikation

Gruppe IV: Tiere mit Kaolin-Arthritis wie in Gruppe III; zusätzlich Vorbehandlung der Ratten mit Phenylbutazon wie in Gruppe II; Tötung der Tiere in einzelnen Serien durch Nackenschlag und anschließendes Ausbluten 2, 4 und 6 Stunden nach der Kaolin-Applikation.

Der nähere Modus der Aufarbeitung der Pfoten sowie der Gewebeproben von Leber und Nieren ist im bisherigen methodischen Teil bereits detailliert beschrieben.

Zwischen Homogenisieren und Beginn der uns interessierenden fermentativen Reaktionen lag ein Zeitraum von maximal 10 Minuten.

Zur Gewinnung von Serum wurde den Tieren Blut entnommen, 15 Minuten stehengelassen und anschließend bei 2500 U.p.M. zentrifugiert.

C. Experimentelle Befunde

Wie einleitend schon erwähnt, erfaßten wir bei normalen Ratten und bei Ratten, an denen durch Injektion einer Kaolinsuspension in die linke Hinterpfote eine örtlich begrenzte Entzündung ausgelöst worden war, neben dem Verlauf der Entzündungsreaktion vor allem das Verhalten esterolytisch bzw. proteolytisch wirksamer Enzymsysteme im Pfotengewebe, in der Leber, in der Niere und im Serum. Dabei überprüften wir auch den Einfluß von Phenylbutazon auf diese Kriterien.

I. Entzündungsversuche

Unsere Befunde sind in Tabelle 1 und Abbildung 7 dargestellt. Die Ratte reagiert auf die subplantar an der Hinterpfote erfolgte Applikation von Kaolin mit einer Schwellung. Das Ausmaß der entzündlichen Reaktion war während der ersten 4 Stunden verhältnismäßig gering, stieg in unseren Versuchen jedoch bis zur 6. Stunde, dem Endpunkt unserer Beobachtung beträchtlich an.

Entzündungs- dauer in Stunden	Kontrolle	Vorbehandlung mit Phenyl- butazon	Hemmung in Prozent
2	240	210	13
4	380	180	53
6	560	115	79

Tab. 1: Ausmaß der Schwellungsreaktion nach Kaolin-Applikation mit und ohne Vorbehandlung der Versuchstiere mit Phenylbutazon

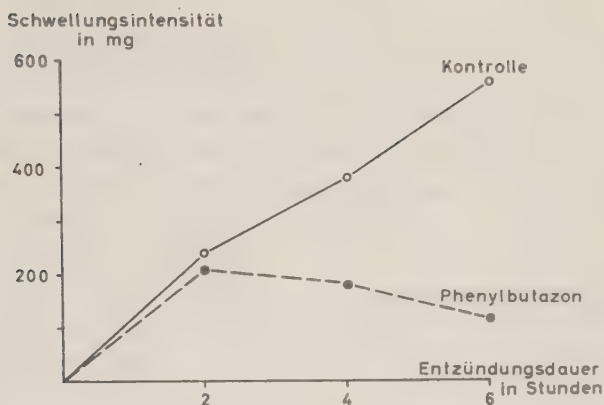


Abb. 7: Schwellungsintensität in Abhängigkeit von der Zeit

Die Vorbehandlung der Versuchstiere mit 300 mg/kg Phenylbutazon, per os verabreicht, bewirkte eine deutliche Abschwächung der entzündlichen Gewebsveränderungen.

II. Das Verhalten esterolytisch bzw. proteolytisch wirksamer Fermentsysteme im Pfotengewebe

Die fermentanalytischen Untersuchungen wurden in vitro mit Homogenaten aus Rattenpfoten durchgeführt. Die Versuchstiere standen unter verschiedenen Bedingungen:

- Gruppe I: unbehandelte, nicht entzündete Tiere
- Gruppe II: nicht entzündete Tiere; Vorbehandlung mit Phenylbutazon
- Gruppe III: entzündete Tiere
- Gruppe IV: entzündete Tiere; Vorbehandlung mit Phenylbutazon

Diese Bedingungen wiederholen sich für die nachstehend unter III, IV und V referierten Versuchsergebnisse.

A: Befunde zum Verhalten der Esteraseaktivität

Entsprechend unserem Vorgehen bei den Entzündungsversuchen, die 2, 4 und 6 Stunden nach der Applikation von Kaolin bewertet wurden, verfügen wir über drei Kontrollserien für die unbehandelten, nicht entzündeten Tiere (Gruppe I). Die Esteraseaktivität der von diesen Kontrolltieren gewonnenen Homogenate betrug im Mittel 0,432 Extinktionseinheiten. Unter der Einwirkung von Phenylbutazon in vivo ergab sich eine deutliche Senkung der esterolytischen Aktivität (Tabelle 2 und Abbildung 8).

Vorbehandlung	Gruppe				
Kontrolle	I	0,432			Esteraseaktivität in Extinktionseinheiten
Phenylbutazon	II	3	5	7	Stunden nach Verabreichung
		0,365	0,355	0,360	Esteraseaktivität in Extinktionseinheiten
		- 16	- 18	- 17	Änd. in Prozent
Entzündung	III	2	4	6	Stunden nach Kaolin-Applikation
		NE	0,330	0,275	0,305
		E	0,400	0,395	0,370
					Esteraseaktivität in Extinktionseinheiten
		+ 21	+ 44	+ 21	Änd. in Prozent
Entzündung + Phenylbutazon	IV	2	4	6	Stunden nach Kaolin-Applikation
		NE	0,325	0,300	0,350
		E	0,320	0,310	0,375
					Esteraseaktivität in Extinktionseinheiten
		- 2	+ 3	+ 6	Änd. in Prozent

Tab. 2: Esteraseaktivität unter Einfluß von Entzündung und Phenylbutazon. NE bzw. E sind Symbole für die aus der nicht entzündeten bzw. entzündeten Pfote des gleichen Tieres gewonnenen Homogenate

Bedeutungsvoller und aussagekräftiger sind unsere Befunde, die für die Gruppen III und IV erhoben wurden, da für diese beiden Beispiele als Bezugsbasis dasselbe Tiermaterial dienen konnte.

In Versuchsgruppe III, entzündete Tiere, zeigten die aus entzündetem Gewebe gewonnenen Homogenate in Relation zu den Homogenaten aus den nicht entzündeten Vergleichsrefoten derselben Tiere eine deutliche Steigerung der esterolytischen Aktivität. Diese Zunahme der esterspaltenden Potenz verlief nicht parallel zu der Schwellungsintensität. Das Maximum lag bei 4 Stunden nach Auslösung der Entzündung, ein Zeitpunkt, zu dem die entzündliche Reaktion erst verhältnismäßig schwach ausgebildet war.

Nach Vorbehandlung der Versuchstiere mit Phenylbutazon fanden wir keinen Unterschied in der Esteraseaktivität zwischen entzündetem und nicht entzündetem Pfotengewebe, ein Befund, der mit der antiphlogistischen Wirkung von Phenylbutazon gegenüber der Kaolin-Arthritis korreliert.

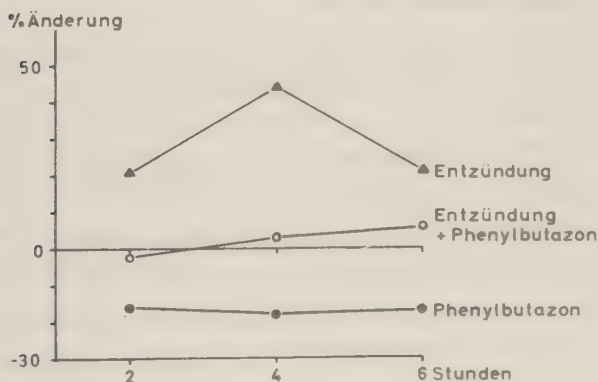


Abb. 8: Esterolytische Aktivität unter verschiedenen Bedingungen (siehe Text)

B: Befunde zum Verhalten der Proteasenaktivität

Das Pfortengewebe der anfallenden Kontrolltiere zeigte eine Proteasenaktivität, die im Durchschnitt 0,770 Extinktionseinheiten betrug. Die Vorbehandlung der normalen, d.h. nicht entzündeten Versuchstiere mit 300 mg/kg Phenylbutazon führte in Abhängigkeit des Applikationszeitpunktes im untersuchten Pfortengewebe zu verschiedenen Graden der proteolytisch wirksamen Fermentaktivität. So fanden wir 3 Stunden nach Verabreichung von Phenylbutazon eine gut nachweisbare Hemmung der autoproteolytischen Vorgänge, 5 Stunden p.a. keine Veränderungen, aber 7 Stunden p.a. eine Steigerung der Proteolyse um 40 Prozent.

In den durch subplantare Applikation von Kaolin entzündlich veränderten Pfortengeweben fanden wir im Vergleich zum nicht entzündeten Pfortengewebe des gleichen Tiermaterials eine deutlich gesteigerte Proteolyse, die, ähnlich dem Verhalten der Esteraseaktivität, nicht direkt proportional der Entzündungsreaktion verlief.

Unter der Einwirkung von Phenylbutazon konnten wir feststellen, daß die entzündungsbedingte Steigerung der proteolytischen Umsatzrate vollständig inhibiert wird; jedoch gilt dieser Befund nur für die Bewertungspunkte 2 und 4 Stunden nach der Kaolin-Applikation. Bei der Überprüfung der Proteasenaktivität, 6 Stunden nach Einleitung der Entzündungsreaktion, fanden wir eine vermehrte Proteolyse.

Die von uns erhobenen Befunde sind in Tabelle 3 und Abbildung 9 dargestellt.

Vorbe- handlung	Gruppe				
Kontrolle	I	0,770			Proteasenaktivität in Extinktions- einheiten
Phenyl- butazon	II	3	5	7	Stunden nach Verabreichung
		0,640	0,790	1,080	Proteasenaktivität in Extinktions- einheiten
		- 17	+ 3	+ 40	Änd. in Prozent
Entzündung	III	2	4	6	Stunden nach Kaolin-Applikation
	NE	0,630	0,450	0,590	Proteasenaktivität
	E	0,750	0,615	0,790	in Extinktions- einheiten
		+ 19	+ 37	+ 34	Änd. in Prozent
Entzündung + Phenyl- butazon	IV	2	4	6	Stunden nach Kaolin-Applikation
	NE	0,560	0,485	0,675	Proteasenaktivität
	E	0,550	0,480	0,820	in Extinktions- einheiten
		- 2	- 1	+ 21	Änd. in Prozent

Tab. 3: Proteasenaktivität unter Einfluß von Entzündung und Phenylbutazon. NE bzw. E sind Symbole für die aus der nicht entzündeten bzw. entzündeten Pfote des gleichen Tieres gewonnenen Homogenate

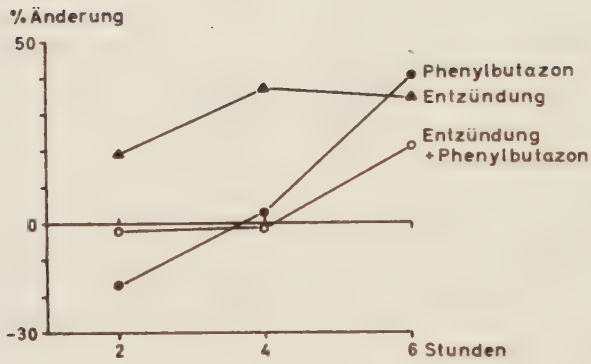


Abb. 9: Proteolytische Aktivität von Pfotenhomogenaten unter verschiedenen Bedingungen

III. Das Verhalten esterolytisch bzw. proteolytisch wirksamer Fermentsysteme im Lebergewebe

Die fermentanalytischen Untersuchungen wurden in vitro mit Homogenaten aus Lebergewebe durchgeführt. Die Art der Vorbehandlung der Versuchstiere ist unter II aufgeführt.

A: Befunde zum Verhalten der Esteraseaktivität

Die Leberhomogenate der Kontrolltiere zeigten eine Umsatzrate für die Esterspaltung von durchschnittlich 0,307 Extinktionseinheiten (Tab. 4).

Vorbe-

handlung Gruppe

Kontrolle	I	0,307			Esteraseaktivität in Extinktionseinheiten
Phenylbutazon	II	3	5	7	Stunden nach Verabreichung
		0,285	0,335	0,395	Esteraseaktivität in Extinktionseinheiten
		- 7	+ 9	+ 29	Änd. in Prozent
Entzündung	III	2	4	6	Stunden nach Kaolin-Applikation
		0,325	0,290	0,305	Esteraseaktivität in Extinktionseinheiten
		+ 6	- 6	- 1	Änd. in Prozent
Entzündung + Phenylbutazon	IV	0,350	0,320	0,325	Esteraseaktivität in Extinktionseinheiten
		+ 14	+ 4	+ 6	Änd. in Prozent

Tab. 4: Esteraseaktivität unter Einfluß von Entzündung und Phenylbutazon

Nach Vorbehandlung der Versuchstiere mit Phenylbutazon ergab sich für den Bewertungszeitpunkt 7 Stunden p.a. dieses Pharmakon eine Steigerung des esterolytischen Umsatzes.

Unter allen anderen Bedingungen fanden wir keine signifikante Änderung der Esteraseaktivität.

B: Befunde zum Verhalten der Proteasenaktivität

Das Lebergewebe normaler, unbehandelter Versuchstiere zeigte unter unseren Versuchsbedingungen eine proteolytische Umsatzrate von durchschnittlich 0,542 Extinktionseinheiten.

Die Vorbehandlung der Versuchstiere mit 300 mg/kg Phenylbutazon bewirkte ab dem Zeitpunkt 5 Stunden p.a. eine Steigerung der Proteolyse (siehe Tab. 5 und Abb. 10).

Vorbe-
handlung Gruppe

Kontrolle	I	0,542			Proteasenaktivität in Extinktions- einheiten
Phenyl- butazon	II	3	5	7	Stunden nach Verabreichung
		0,540	0,625	0,680	Proteasenaktivität in Extinktions- einheiten
		- 1	+ 15	+ 25	Änd. in Prozent
Entzündung	III	2	4	6	Stunden nach Kaolin-Applikation
		0,510	0,565	0,710	Proteasenaktivität in Extinktions- einheiten
		- 6	+ 4	+ 31	Änd. in Prozent
Entzündung + Phenyl- butazon	IV	2	4	6	Stunden nach Kaolin-Applikation
		0,530	0,605	0,760	Proteasenaktivität in Extinktions- einheiten
		- 2	+ 12	+ 40	Änd. in Prozent

Tab. 5: Proteasenaktivität unter Einfluß von Entzündung und Phenylbutazon

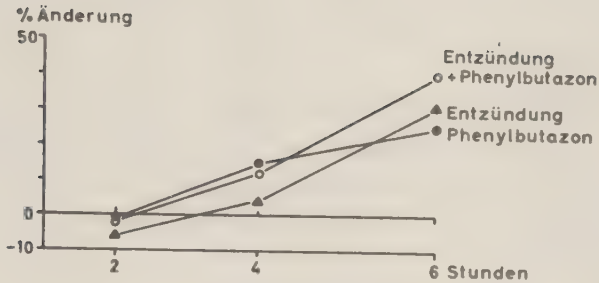


Abb. 10: Proteolytische Aktivität von Leberhomogenaten unter verschiedenen Bedingungen

In den Homogenaten, die aus dem Lebergewebe der entzündeten Tiere (Gruppe III) zubereitet worden waren, fanden wir nach einer Entzündungsdauer von 6 Stunden eine gut nachweisbare Zunahme der Autoproteolyse, während die proteolytische Aktivität der Homogenate bei kürzerer Entzündungsdauer gegenüber der Norm nicht verändert war. Das gleiche Verhalten beobachteten wir bei den Leberhomogenaten von entzündeten Tieren (Gruppe IV), die gleichzeitig mit Phenylbutazon vorbehandelt waren.

IV. Das Verhalten esterolytisch bzw. proteolytisch wirksamer Fermentsysteme in Nierengewebe

Die fermentanalytischen Untersuchungen wurden in vitro mit Homogenaten aus Nierengewebe durchgeführt. Die Art der Vorbehandlung der Versuchstiere ist diejenige wie unter II aufgeführt.

A: Befunde zum Verhalten der Esteraseaktivität

Die aus dem Nierengewebe der Normaltiere zubereiteten Homogenate wiesen für die ATEE-Spaltung eine durchschnittliche Umsatzrate von 0,517 Extinktionseinheiten auf (Tab. 6 und Abb. 11).

Die Verabreichung von Phenylbutazon führte zu einer Hemmung der esterolytischen Aktivität; dieses Verhalten ist abhängig von der Verweildauer von Phenylbutazon im Organismus, da zum letzten Zeitpunkt der Untersuchung eine Hydrolysehemmung nicht mehr beobachtet wurde.

Unter dem Einfluß der MacLin-Arthritis fanden wir für das Nierengewebe nach einer Entzündungsdauer von 2 Stunden eine angedeutete Steigerung der Esteraseaktivität, nach 4 Stunden Entzündungsdauer keinen Unterschied zur Norm, 6 Stunden nach Einleitung der Entzündung hingegen eine angedeutete Verminderung der esterolytischen Umsatzrate. Das Nierengewebe der Tiere mit Entzündung und gleichzeitiger Vorbehandlung mit Phenylbutazon zeigte hinsichtlich der ATEE-Spaltung Umsatzwerte, die im Vergleich zu den Kontrollen nicht wesentlich verändert waren.

Vorbe- handlung	Gruppe				
Kontrolle	I	0,613			Esteraseaktivität in Extinktions- einheiten
Phenyl- butazon	II	3	5	7	Stunden nach Verabreichung
		0,495	0,485	0,565	Esteraseaktivität in Extinktions- einheiten
		- 19	- 21	- 3	Änd. in Prozent
Entzün- dung	III	2	4	6	Stunden nach Kaolin-Applikation
		0,700	0,615	0,530	Esteraseaktivität in Extinktions- einheiten
		+ 14	0	- 14	Änd. in Prozent
Entzün- dung + Phenyl- butazon	IV	2	4	6	Stunden nach Kaolin-Applikation
		0,640	0,665	0,640	Esteraseaktivität in Extinktions- einheiten
		+ 4	+ 11	+ 4	Änd. in Prozent

Tab. 6: Esteraseaktivität unter Einfluß von Entzündung und Phenylbutazon

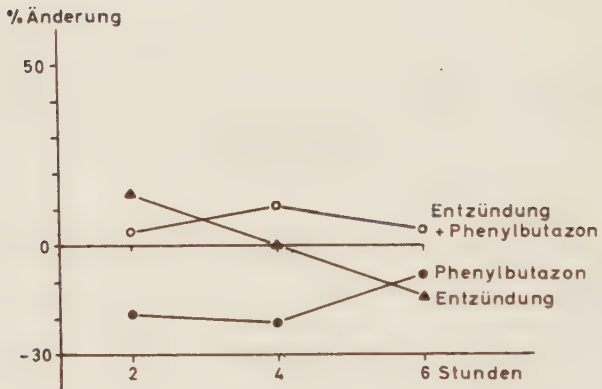


Abb. 11: Esterolytische Aktivität in Nierenhomogenaten unter verschiedenen Bedingungen

B: Befunde zum Verhalten der Proteasenaktivität

Die unter verschiedenen Bedingungen erhobenen Befunde zur Proteasenaktivität im Nierengewebe (Tab. 7) unterscheiden sich im allgemeinen nicht von der Norm. Erwähnenswert ist lediglich die angedeutete Steigerung der proteolytischen Umsatzrate nach einer Entzündungsdauer von 6 Stunden.

Vorbe- handlung	Gruppe				
Kontrolle	I	0,613			Proteasenaktivität in Extinktions- einheiten
Phenyl- butazon	II	3	5	7	Stunden nach Verabreichung
		0,630	0,640	0,580	Proteasenaktivität in Extinktions- einheiten
		+ 3	+ 4	- 5	Änd. in Prozent
Entzün- dung	III	2	4	6	Stunden nach Kaolin-Applikation
		0,625	0,620	0,690	Proteasenaktivität in Extinktions- einheiten
		+ 2	+ 1	+ 13	Änd. in Prozent
Entzün- dung + Phenyl- butazon	IV	2	4	6	Stunden nach Kaolin-Applikation
		0,640	0,665	0,640	Proteasenaktivität in Extinktions- einheiten
		+ 4	+ 8	+ 4	Änd. in Prozent

Tab. 7: Proteasenaktivität unter Einfluß von Entzündung und Phenylbutazon

V. Das Verhalten esterolytisch wirksamer Fermentsysteme im Serum

Die Serumansätze der Kontrolltiere zeigten eine ATEE-Hydro-
lyserate von 0,320 Extinktionseinheiten.

Phenylbutazon bewirkte eine sehr deutliche Hemmung der
esterolytischen Aktivität. Das Maximum der Wirkung wurde
5 Stunden nach der Verabreichung dieses Antiphlogistikums
erreicht (Tab. 8 und Abb. 12).

Vorbe-
handlung Gruppe

Kontrolle	I	0,320			Esteraseaktivität in Extinktions- einheiten
Phenyl- butazon	II	3	5	7	Stunden nach Verabreichung
		0,100	0,080	0,110	Esteraseaktivität in Extinktions- einheiten
		- 69	- 75	- 66	Änd. in Prozent
Entzündung	III	2	4	6	Stunden nach Kaolin-Applikation
		0,325	0,265	0,335	Esteraseaktivität in Extinktions- einheiten
		+ 2	- 17	+ 5	Änd. in Prozent
Entzündung + Phenyl- butazon	IV	2	4	6	Stunden nach Kaolin-Applikation
		0,125	0,100	0,080	Esteraseaktivität in Extinktions- einheiten
		- 61	- 69	- 75	Änd. in Prozent

Tab. 8: Esteraseaktivität unter Einfluß von Entzündung und
Phenylbutazon

Die durch Kaolin ausgelöste Entzündung an der Rattenpfote führte innerhalb 6 Stunden nach Einleitung der Entzündungsreaktion zu keiner mit Sicherheit erfaßbaren Änderung der esterolytischen Aktivität im Serum.

Bei den entzündeten Tieren, die gleichzeitig einer Behandlung mit Phenylbutazon unterworfen waren, fanden wir wiederum eine deutliche Hemmung der Esterolyse, entsprechend den oben beschriebenen Befunden.

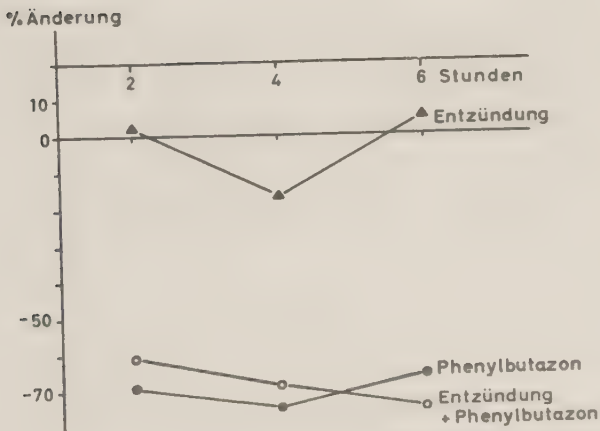


Abb. 12: Esterolytische Aktivität im Serum unter verschiedenen Bedingungen

D. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir bei der Ratte im Pfortengewebe, im Lebergewebe sowie im Nierengewebe die Aktivität proteolytisch und esterolytisch wirksamer Fermentsysteme; letztere auch im Serum. Dabei interessierten uns insbesondere Änderungen der Fermentaktivitäten in Abhängigkeit einer an der Rattenpfote lokalisiert ablaufenden experimentellen Entzündung (Kaolin-Arthritis) sowie in Abhängigkeit einer durchgeführten Vorbehandlung der Versuchstiere mit Phenylbutazon.

Zunächst kann festgestellt werden, daß aus Pforten-, Leber- und Nierengewebe gewonnene Homogenate sowie das Serum normaler Ratten ein Ferment oder Fermentsystem enthalten, das in der Lage ist, den synthetischen Aminosäureester Acetyltyrosinäthylester (ATEE) zu spalten. Diese Reaktion kann quantitativ verfolgt werden. Die Homogenate von Pforten-, Leber- und Nierengewebe zeigen weiterhin eine autoproteolytische Aktivität, die ebenfalls quantitativ erfaßbar ist.

Im folgenden seien die in unseren Untersuchungen erhobenen Befunde, getrennt nach den verschiedenen Versuchsbedingungen, diskutiert.

1. Vorbehandlung der Versuchstiere mit Phenylbutazon

Normale, d.h. Versuchstiere ohne Entzündung wurden mit 300 mg/kg Phenylbutazon per os vorbehandelt. In den Zeitabständen 3, 5 und 7 Stunden nach der Applikation von Phenylbutazon wurden die oben erwähnten Gewebe sowie das Serum hinsichtlich ihrer esterolytischen und proteolytischen Fermentaktivitäten untersucht. Ein Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit den Normalwerten ergibt folgendes Bild: Die Esteraseaktivität im Pfortengewebe wurde um rund 17% vermindert gefunden. Der Effekt war für alle Bewertungszeitpunkte gleich stark. Ein weitgehend andersartiges Verhalten fanden wir für die proteolytische Fermentaktivität nach Vorbehandlung

der Versuchstiere mit Phenylbutazon. Während die proteolytische Umsatzrate zum Zeitpunkt 3 Stunden nach Verabreichung des Pharmakon deutlich vermindert war, zeigte sie sich 5 Stunden post applicationem unverändert und war nach weiteren 2 Stunden sogar deutlich gesteigert (40%). In diesem Zusammenhang kann an die Enzym-induzierende Wirkung von Phenylbutazon gedacht werden, ähnlich wie dies von REMMER u. Mitarb. für mikrosomale Enzyme der Leberzelle beschrieben wurde.

Nach Vorbehandlung der Versuchstiere mit Phenylbutazon zeigten aus Lebergewebe gewonnene Homogenate ein ähnliches Verhalten. In diesem Falle war allerdings die Fermentaktivität beider Fermentsysteme einer Änderung unterworfen. Während zum ersten Bewertungszeitpunkt beide Reaktionen unbeeinflusst waren, zeigte sich später, in besonders deutlichem Ausmaß 7 Stunden nach der Verabreichung von Phenylbutazon, eine gegenüber der Norm gesteigerte ATEE-Hydrolyse und ebenso ein vermehrter proteolytischer Umsatz.

Ein wiederum anderes Verhalten ergab sich für Homogenate, die aus Nierengewebe gewonnen waren. Bei diesem Beispiel war der proteolytische Umsatz nicht verändert. Die ATEE-Spaltung jedoch war zu den beiden ersten Bewertungszeitpunkten deutlich gehemmt, verlief später aber im Rahmen der Norm.

Diese z.T. verschiedenartigen Befunde sind nur schwer zu erklären und obliegen in ihrer Deutung ohne weitere Untersuchungen praktisch einer Spekulation. Zum Beispiel besteht die Möglichkeit, daß für die einzelnen von uns untersuchten Gewebe verschiedene proteolytisch bzw. esterolytisch wirksame Enzyme in Betracht zu ziehen sind. Andererseits wäre auch die Verteilung von Phenylbutazon in den einzelnen Geweben, sowohl quantitativ, wie auch in Abhängigkeit von der Applikationsdauer sowie die Ausscheidungsfunktion der Niere zu berücksichtigen. Auch eine differente Beeinflussbar-

keit der einzelnen Enzymsysteme durch verschieden große, zur Verfügung stehende, Konzentrationen an Phenylbutazon wäre in Betracht zu ziehen. Dafür sprechen vielleicht die für das Serum erhobenen Befunde. Die esterolytische Aktivität im Serum wurde während der gesamten Beobachtungsdauer praktisch im gleichen Ausmaß im Sinne einer Hemmung beeinflusst. Setzt man diesen für das Serum erhobenen Befund in Relation zu Versuchsergebnissen in vitro (2, 17), so läßt sich vielleicht im Hinblick auf die niedrige Halbwertszeit von Phenylbutazon bei der Ratte, die Aussage treffen, daß das im Serum vorhandene, ATEE-spaltende Enzymsystem im Vergleich zu den anderen Geweben durch das hier in seiner Wirkung zur Diskussion stehende Antiphlogistikum in besonderem Maße beeinflusst wird. Vergleichbare Untersuchungen über das Verhalten der esterolytischen Fermentaktivität mit dem von uns verwendeten Substrat unter diesen Bedingungen liegen in der Literatur nicht vor.

2. Versuchstiere mit Entzündung

Wir fanden bei unseren Untersuchungen eine gute Bereitschaft der Versuchstiere auf die Injektion von Kaolin in die Pfote mit einer lokalisierten, entzündlichen Gewebsveränderung zu antworten. Diese Reaktion verlief deutlich zeitabhängig. Ein Maximum war während der Beobachtungsdauer bis zu 6 Stunden nicht erfaßbar.

Die ATEE-Spaltung war in den Homogenaten aus entzündlich verändertem Pfotengewebe deutlich gesteigert. Das Maximum der ATEE-Hydrolyse fanden wir 4 Stunden nach der Kaolin-Applikation. Im Gegensatz dazu war für das Leber- und Nierengewebe sowie für das Serum keine erhöhte esterolytische Umsatzrate feststellbar. Die für das Pfotengewebe erhobenen Befunde stimmen mit den Ergebnissen von HLADOVEC und RYBAK für das Beispiel der Kaolin-Arthritis und mit Befunden bezüglich des Verhaltens dieses Enzymsystems bei anderen

experimentellen Entzündungsmodellen wie z.B. Dextran-, Formalin- und Trypsinödem überein (5, 6, 16, 18).

Für das Serum von Ratten mit Kaolin-Entzündung wird von HLADOVEC und RYBAK eine Tendenz zu einem Anstieg der Esteraseaktivität, gemessen an der ATEE-Spaltung, beschrieben. DONNER fand für das Beispiel der Formalin-bedingten Entzündung keinen Unterschied zu der Fermentaktivität im Serum normaler Ratten.

In ähnlicher Weise wie für die ATEE-Spaltung beobachtet, fanden wir im Gewebe der entzündeten Rattenpfoten im Vergleich zur Norm eine gesteigerte proteolytische Aktivität, die mit Fortdauer der Entzündungsreaktion zunahm, ab dem Bewertungszeitpunkt 4 Stunden nach der Kaolin-Injektion jedoch weitgehend unverändert blieb. Dieses Versuchsergebnis stimmt mit in der Literatur niedergelegten Befunden, die bei anderen Entzündungsmodellen gewonnen wurden, gut überein (1, 8, 12, 13, 16, 23).

Für das Lebergewebe fanden wir im Gegensatz zu den die ATEE-Hydrolyse betreffenden Befunden, für den letzten Bewertungszeitpunkt, d.h. 6 Stunden nach der Kaolin-Applikation, eine Steigerung der proteolytischen Umsatzrate. Möglicherweise spiegelt sich in diesem Befund eine entzündungsbedingte Reaktion wider, die in einem Gewebe abläuft, das fern des Entzündungsortes liegt. Eine Bereitstellung proteolytisch wirksamer Enzyme von Seiten der Leber, auch im Rahmen lokalisierter ablaufender Entzündungsreaktionen, wäre durchaus denkbar. Bemerkenswert ist, daß das Nierengewebe auf die an der Rattenpfote verlaufende Entzündung praktisch nicht reagiert.

3. Versuchstiere mit Entzündung und Vorbehandlung mit Phenylbutazon

Die Vorbehandlung der Versuchstiere mit 500 mg/kg Phenylbutazon, per os verabreicht, bewirkte eine deutliche Hem-

mung der an der Rattenpfote ablaufenden entzündlichen Gewebsveränderungen. Der antiphlogistische Effekt nahm interessanterweise mit der Dauer der Entzündung zu, ein Befund, der für die Beeinflussung der Kaolin-Arthritis durch Phenylbutazon typisch zu sein scheint. Auf ein derartiges Verhalten, d.h. auf eine bessere Beeinflussbarkeit der Kaolin-Arthritis in ihrer zweiten Phase durch Corticosteroide und bestimmte nichtsteroidale Antiphlogistika machte erstmals VINEGAR aufmerksam. Wir fanden dies in unseren Versuchen bestätigt.

Die im entzündlich veränderten Gewebe gesteigert ablaufende ATEE-Hydrolyse wurde durch die erfolgte Verabreichung von Phenylbutazon auf die Ausmaße einer normalen ATEE-Spaltung reduziert, d.h. wir fanden keinen Unterschied in der esterolytischen Umsatzrate im Vergleich zu dem nicht entzündeten Pfotengewebe der gleichen Tiere. Für das Beispiel der Kaolin-Arthritis fanden auch HLADOVEC und RYBAK nach Vorbehandlung der Versuchstiere mit Phenylbutazon, Procain und einem aus Kartoffeln isolierten Proteasen-Inhibitor eine Abschwächung der esterolytischen Wirkung. Das gleiche berichtet DONNER für Phenylbutazon in Zusammenhang mit der Formalin- bzw. Trypsin-bedingten Entzündung und für Natrium-salicylat in Zusammenhang mit dem Dextranödem.

Aus all diesen Befunden stellt sich die interessante Frage, ob die reduzierte Esteraseaktivität Ausdruck einer verminderten Entzündungsreaktion ist oder auf eine direkte Phenylbutazonwirkung zurückgeführt werden kann. Hierauf soll nicht näher eingegangen werden. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist jedoch, daß in vitro eine Hemmung der ATEE-Spaltung in Pfotenhomogenaten durch Phenylbutazon schon in einer Endkonzentration von 1,0 mg% zu beobachten ist (2, 16, 17).

Die esterolytische Fermentaktivität in Leber- und Nierengewebe entzündeter Tiere war durch die Vorbehandlung mit Phenylbutazon praktisch nicht beeinflusst.

Für das Serum fanden wir hingegen eine sehr markante Hemmung der ATEE-Hydrolyse, die den erhobenen Befunden unter alleiniger Vorbehandlung der Versuchstiere mit Phenylbutazon entspricht.

Die im Pfotengewebe unter der entzündlichen Reaktion gesteigert ablaufenden proteolytischen Prozesse wurden durch die Vorbehandlung der Versuchstiere mit Phenylbutazon deutlich gehemmt. Diese Wirkung konnten wir jedoch nur für die beiden ersten Bewertungszeitpunkte beobachten. 6 Stunden nach der Kaolin-Applikation, i.e. 7 Stunden nach der Verabreichung von Phenylbutazon, fanden wir im Verhältnis zu dem nicht entzündeten Pfotengewebe einen gesteigerten proteolytischen Umsatz. Dieser Befund ist weitgehend vergleichbar mit unserem Versuchsergebnis nach Vorbehandlung der nicht entzündeten Versuchstiere mit Phenylbutazon, wenn auch unter dieser Bedingung eine größere Steigerung der proteolytischen Prozesse beobachtet wurde. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß ähnlich wie für die Beeinflussung der ATEE-Hydrolyse beschrieben, die proteolytische Umsatzrate von Pfotenhomogenaten in vitro durch Phenylbutazon oder andere Antiphlogistika konzentrationsabhängig gehemmt werden kann (8, 15, 16, 23). So ergibt sich z.B. für Phenylbutazon ab einer Endkonzentration von 5,0-10,0 mg% eine gut nachweisbare Hemmung des proteolytischen Umsatzes in Pfotenhomogenaten. Von MÜRSORF, MARTEK und FUCHERT wird diese antiproteolytische Wirkung von Phenylbutazon aufgrund fermentkinetischer Untersuchungen dahingehend erklärt, daß Phenylbutazon durch seine Anlagerung an ein Substratprotein dieses vor seinem Abbau schützt.

Im Lebergewebe entzündeter und mit Phenylbutazon vorbehandelter Tiere fanden wir praktisch die gleichen Verhältnisse wie zuvor schon unter 1. und 2. geschildert, d.h. daß zu unserem letzten Bewertungszeitpunkt 6 Stunden nach Auslösung

der Entzündung die proteolytische Aktivität im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöht war. Im Nierengewebe hingegen zeigten sich keine typischen Veränderungen.

Die von uns erhobenen Befunde wären im einzelnen besser zu deuten, wenn die jeweilige Gewebskonzentration an Phenylbutazon zu den verschiedenen Bewertungszeitpunkten bekannt wäre. Angaben über die Halbwertszeit oder Angaben über das Verteilungsmuster von Phenylbutazon in den einzelnen Geweben (9, 20) sind für unsere Untersuchungen nur von bedingtem Wert (9). Die von uns für das Beispiel Serum als Fermentgeber beobachtete markante Hemmung der ATSE-Hydrolyse erklärt sich ohne weiteres aus dem verhältnismäßig hohen Blutspiegel für Phenylbutazon, der nach PULVER, EXER und HERRMANN 6 Stunden nach intravenöser Injektion von 75 mg/kg Phenylbutazon an der Ratte mit 11,8 mg% höher liegt als für andere Gewebe. Eine Metabolisierung des Phenylbutazon kann dabei unberücksichtigt bleiben, da auch der Hauptmetabolit, das Oxyphenbutazon, die gleiche anti-esterolytische Wirkung aufweist wie Phenylbutazon selbst (17). Das Lebergewebe weist nach PULVER, EXER und HERRMANN unter den oben erwähnten Bedingungen mit 8,3 mg% Phenylbutazon eine im Vergleich zu anderen Geweben -Niere 5,4 mg%, Herz 2,7 mg%, Milz 2,3 mg%, Muskel 0,9 mg% - verhältnismäßig hohe Konzentration dieses Pharmakons auf. In unseren Untersuchungen hätte man demnach und außerdem basierend auf den schon vielfach zitierten Befunden mit Zusatz von Phenylbutazon in vitro eine Hemmung esterolytischer und proteolytischer Prozesse im Lebergewebe erwarten dürfen. Für beide Kriterien fanden wir aber ein weitgehend entgegengesetztes Verhalten.

2. Zusammenfassung

Pfoten-, Leber- und Lungenewebe von Ratten enthalten proteolytisch und esterolytisch (ATEE-Hydrolyse) wirksame Fermentsysteme. Ein ATEE-spaltendes Ferment findet sich auch im Serum.

Wir untersuchten Aktivitätsänderungen dieser beiden Enzymsysteme

- a) unter dem Einfluß einer in vivo durchgeführten Behandlung normaler Versuchstiere mit Phenylbutazon (300 mg/kg per os),
 - b) unter dem Einfluß einer mit Hilfe von Kaolin an der Rattenpfote ausgelösten Entzündung,
 - c) unter dem Einfluß von Entzündung und gleichzeitig durchgeführter Behandlung mit Phenylbutazon,
- alles in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Entzündungsauslösung bzw. der Verabreichung von Phenylbutazon.

Die Applikation von Kaolin in die Rattenpfote führte zu einer örtlich begrenzten Entzündungsreaktion, die durch Phenylbutazon gehemmt werden konnte.

Bedingt durch die entzündlichen Gewebsveränderungen, fanden wir für das Pfotenewebe eine Steigerung esterolytischer und proteolytischer Prozesse. Nach einer Vorbehandlung der Versuchstiere mit Phenylbutazon war die Umsatzrate beider Fermentreaktionen gegenüber den entsprechenden Kontrollen vermindert.

Für das Lebergewebe zeigte sich zum Versuchsausgangspunkt 6 Stunden nach der Entzündungsauslösung eine Steigerung der proteolytischen Aktivität. Möglicherweise ereignet sich in diesem Befund eine entzündungsabhängige Reaktion wider, die in einem Gewebe abläuft, das von der Entzündung direkt nicht betroffen ist. Besonders auffällig ist, daß Phenylbutazon

allein im Lebergewebshomogenat 7 Stunden post applicationem eine Steigerung sowohl der proteolytischen als auch der esterolytischen Umsatzrate bewirkte, ein Befund, der vielleicht im Sinne einer Fermentinduktion zu deuten ist.

Für das Nierengewebe ergaben sich unter den verschiedenen Versuchsbedingungen keine wesentlichen Abweichungen von der Norm, abgesehen von einer geringen Hemmung der ATEE-Hydrolyse nach Verabreichung von Phenylbutazon an nicht entzündeten Tieren.

Im Serum fanden wir bei den entzündeten Tieren keine Änderung der ATEE-Aktivität. Die Vorbehandlung der Versuchstiere mit Phenylbutazon bewirkte jedoch eine deutliche Hemmung der esterolytischen Umsatzrate.

F. Literaturverzeichnis

1. BAZIN, S. u. DELAUNAY, A.

Modifications in activity of different proteolytic enzymes in inflamed tissues of normal and oxyphenbutazone treated rats

in: Lindner, J. und Wilhelm, E., Die infektiöse Entzündung

Intern. Symp., Adelboden 1967, 151-171

Hans Huber, Bern und Stuttgart

2. CORNELISSEN, G.

Der Einfluß von Antiphlogistika auf ein esterolytisches Fermentsystem, das bei entzündlichen Gewebsreaktionen aktiviert wird

Dissertation, Med. Fak., Bonn (1966)

3. DOBENJOZ, R.

The pharmacology of phenylbutazone analogues

Ann. N.Y. Acad. Sci. 86, 263-291 (1960)

4. DOBENJOZ, R.

Synthetic anti-inflammatory drugs: Concepts of their mode of action

Advances in Pharmacol., 4, 143-217 (1966)

5. DONNER, I.

Die Aktivierung esterolytischer Prozesse bei der experimentellen Entzündung

Dissertation, Med. Fak., Bonn (1966)

6. DONNER, I. u. MÖRS DORF, K.

Aktivierung Ester-spaltender Fermente im Zusammenhang mit der Entzündung

in: Die Entzündung

Grundlagen und pharmakologische Beeinflussung

Intern. Symp., Freiburg/Breisgau 1966, 175-176

Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien

7. GARATTINI, S., JORI, A., BERNARDI, D., CARRARA, C.,
PASQUALUNGA, S. u. SERGE, D.
Sensitivity of local oedemas to systemic pharmacological effects
Proc. of an Intern. Symp. on non-steroidal anti-inflammatory drugs, Milan 1964
Excerpta med. Intern. Congress Series No 82, 151-161
8. HART, D.
Die Beeinflussung der bei der Dextranentzündung aktivierten Proteasen durch Antiphlogistika in vitro
Dissertation, Med. Fak., Bonn (1967)
9. HEISE, E.R. u. KIMBEL, K.H.
Untersuchungen über die Wirkung von 3,5-Dioxo-1,2-diphenyl-4-n-butyl-pyrazolidin bei der Ratte
Arzneim. Forsch., 6, 722-724 (1956)
10. HILLBRECHT, J.
Zur routinemäßigen Prüfung antiphlogistischer Substanzen im Rattenpfotentest
Arzneim. Forsch., 4, 607-614 (1954)
11. HLADOVEC, J. u. RYBAK, M.
A specific esterase in experimental inflammation
Biochem. Pharma ol., 12, 1058-1061 (1963)
12. KALBHEN, D.A.
Bestimmung der freien Aminosäuren im gesunden und entzündeten Pfortengewebe der Ratte
Arch. int. Pharmacodyn., 143, 337-361 (1963)
13. KALBHEN, D.A. u. DOMENJOZ, R.
Zeitlicher Verlauf der Schwellung und der Konzentration an freien Aminosäuren nach lokaler Injektion von Trypsin
Med. Pharmacol. exp., 15, 97-101 (1966)

14. KAUFMANN, S. u. Mitarb.
zit. nach E. Waldschmidt-Leitz u. C. Kirchmeier:
Chemie der Eiweißkörper
Ferdinand Enke-Verlag, Stuttgart 1962
15. MÖRSDORF, K.
The influence of antiphlogistics on tissue proteases
Proc. of an Intern. Symp. on non-steroidal anti-inflammatory drugs, Milan 1964
Excerpta med. Intern. Congress Series No 82, 85-89
16. MÖRSDORF, K.
Proteolytische und esterolytische Prozesse im entzündeten Gewebe
in: Die Entzündung
Grundlagen und pharmakologische Beeinflussung
Intern. Symp., Freiburg/Breisgau 1966, 152-157
Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien
17. MÖRSDORF, K. u. CORNELISSEN, G.
Beitrag zur Auswertung antiphlogistisch wirksamer
Pharmaka in vitro
Med. Pharmacol. exp., 15, 399-403 (1966)
18. MÖRSDORF, K., DONNER, I. u. CORNELISSEN, G.
Verhalten eines gewebsseitigen, Ester-hydrolysierenden
Enzymsystems bei Gewebsschädigung und dessen Beeinflussung durch Antiphlogistika
Arch. exp. Path. Pharmacol., 253, 74 (1966)
19. MÖRSDORF, K., MARTEN, S. u. FUCHERT, I.
Ein Beitrag zur antiproteolytischen Wirkungsqualität
von Phenylbutazon, Oxyphenbutazon und Natriumsalicylat
Arzneim. Forsch., 13, 1516-1520 (1968)

20. PULVER, R., EXER, B. u. HERRMANN, B.

Über die Beeinflussung enzymatischer Reaktionen durch Phenylbutazon und über die Übertragbarkeit ferment-chemischer Befunde auf die Stoffwechselprozesse der Zelle

Schweiz. med. Wschr., 86, 1030-1035 (1956)

21. REIMER, H., SIEGERT, M. u. LIEBENSCHÜTZ, H.W.

Die Beschleunigung der Oxydation von Arzneimitteln während und nach der Behandlung mit Luminal

Klin. Wschr., 39, 490-491 (1961)

22. RYBAK, M., MANSFELD, V., PETAKOVA, H. u. SIMONIANOVA, E.

A new method of quantitative determination of enzymes splitting N-Acetyl-Tyrosin-Ethylester

Clin. Chim. Acta, 19, 405-409 (1968)

23. SCHULZE, G.

Die Beeinflussung der Formalin-induzierten Proteasen-aktivierung durch Antiphlogistika in vitro

Dissertation, Med. Fak., Bonn (1967)

24. VINEGAR, R.

Quantitative studie concerning Kaolin edema formation in rat

J. Pharmacol. Exp. Therap., 161, 389-395 (1968)

25. WAGNER-JAUREGG, Th., JAHN, U. u. BÜCH, O.

Die antiphlogistische Prüfung bekannter Antirheumatika am Rattenpfoten-Kaolinödem

Arzneim. Forsch., 12, 1160-1162 (1962)

26. WILHELMI, G.

Über die kombinierte Anwendung von Butazolidin (Phenylbutazon) und einiger Corticosteroide bei experimentellen Entzündungen

Schweiz. med. Wschr., 88, 185-188 (1958)

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von
Herrn Prof. Dr. med. K. Mörsdorf im Pharmakologischen
Institut der Universität Bonn durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. med. R. Domenjoz, Direktor des Pharma-
kologischen Institutes, danke ich für die Überlassung
des Arbeitsplatzes und die Bereitstellung der Mittel.

Herrn Prof. Dr. med. K. Mörsdorf bin ich zu ganz besonde-
rem Dank verpflichtet für die Überlassung des Themas und
seine Hilfsbereitschaft bei der Fertigstellung meiner
Arbeit.

Lebenslauf

Am 8.2.1936 wurde ich als Sohn des Kriminalbeamten Albert Müller-Velten und seiner Ehefrau Hedwig, geb. Funke, in Essen geboren.

Nach Absolvierung der Grundschule besuchte ich in Essen das mathematisch-naturwissenschaftliche Alfred-Krupp Gymnasium, an dem ich 1956 die Reifeprüfung bestand.

Im SS 1956 begann ich das Studium der Zahnheilkunde an der Universität Münster. Dort bestand ich im Jahre 1959 die Zahnärztliche Vorprüfung. An der Universität Bonn legte ich im Jahre 1965 das Zahnärztliche Staatsexamen ab.

